

**WYKORZYSTANIE SPEKTROMETRII MAS  
DO ANALIZY MODYFIKACJI NUKLEOTYDÓW  
I ADDUKTÓW DNA**

**APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY METHODS  
FOR ANALYSIS OF MODIFIED NUCLEOTIDES  
AND DNA ADDUCTS**

**Jakub Hanus, Karol Jelonek, Monika Pietrowska**

*Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,  
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach,  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice*

---

Abstract

1. Addukty DNA i ich znaczenie biologiczne
2. Metody wykorzystywane do analizy adduktów DNA
3. Metody spektrometrii mas wykorzystywane do analizy modyfikacji nukleotydów
4. Wykorzystanie spektrometrii mas do analizy metylacji DNA

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

---



**dr Jakub Hanus** (ur. 1982 r.) absolwent biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Prace magisterską wykonał w Zakładzie Radiobiologii Doświadczalnej w Centrum Onkologii oddział w Gliwicach. Po uzyskaniu tytułu magistra kontynuował pracę naukową w Centrum Onkologii, gdzie w 2010 roku uzyskał tytuł doktora. Obecnie pracuje w University of Texas Southwestern Medical Center w Dallas, USA.



**Monika Pietrowska** (ur. 1974 r.) uzyskała stopień magistra z biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (1998 r.), a stopień doktora nauk medycznych w 2005 w Centrum Onkologii oddział w Warszawie. Zainteresowania naukowe obejmują wykorzystanie technik spektrometrii w analizie proteomu surowicy krwi i identyfikacji indywidualnych wzorów peptydowych pacjentów chorujących na nowotwory. Obecnie zatrudniona w Centrum Onkologii w Gliwicach kontynuuje pracę naukową.



**Karol Jelonek** (ur. 1983 r.) absolwent technologii chemicznej (z wyróżnieniem) na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Prace magisterską wykonał w Zakładzie Radiobiologii Doświadczalnej w centrum Onkologii w Gliwicach. Pan mgr inż. Karol Jelonek uzyskał również tytuł magistra radiobiologii na Wydziale Onkologii University College London w Londynie. Obecnie kontynuuje pracę naukową w ramach studiów doktoranckich w Centrum Onkologii w Gliwicach.

## ABSTRACT

Chemically modified nucleotides, which are not normally present in genetic material, are called DNA adducts. This type of DNA modifications (damage) is directly related to processes of mutagenesis and carcinogenesis. Elevated levels of DNA adducts present in genetic material reflect exposure of humans to carcinogenic factors and are markers of increased risk of cancer [1]. For this reason different methods useful for quantitative and qualitative analyses of DNA adducts are used in the field of cancer prevention and research (Tab. 1). Enzymatically-catalyzed methylation of cytosine, observed mostly in so called CpG islands, is a frequent endogenous modification of genetic material. Such a DNA methylation is a key factor involved in regulation of gene expression, and methylation status of oncogenes and tumor suppressor genes is an important biomarker of carcinogenesis. As such, analytical methods for assessment of DNA methylation are of great importance for molecular diagnostics of cancer.

During the last decade significant progress has been made in methods available for quantitative, qualitative and structural analyses of biological molecules. Among intensively developed tools for bioanalyses are methods of mass spectrometry. Spectrometers that are based on two methods of ionization, namely electrospray ionization (ESI) [30] and matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) [48], are particularly suitable for analyses of biological macromolecules: proteins and nucleic acids. Currently available mass spectrometers, together with microscale methods for sample preparation and separation, significantly increased sensitivity and accessible mass range of analyses. New generation of "user-friendly" instruments is developed to bring the techniques directly into the workplaces of biological and clinical investigators.

This review demonstrates representative examples of mass spectrometry techniques used for qualitative analyses of nucleotide modifications and adducts present in genetic material of humans. In this field several methods base on spectrometers with electrospray ionization. Generated ions are separated according to their mass-to-charge ratio in an analyzer by electric fields; among different ion analyzers frequently used in this methods are single or triple quadrupole and ion traps (Fig. 1). Among other methods available for assessment of DNA adducts is so called Accelerator Mass Spectrometry (Fig. 2) [41]. The most frequently applied method for the assessment of DNA methylation is based on methylation-specific PCR reaction. Products of such PCR reactions are analyzed using MALDI mass spectrometry [54] (Fig. 3). In summary, new powerful methods of mass spectrometry that made available qualitative analyses of damage and modifications of human genetic material found their important place in modern biological and medical laboratories.

**Keywords:** carcinogenesis, molecular diagnostics, mass spectrometry, nucleotides, DNA damage, DNA adducts, DNA methylation

**Słowa kluczowe:** kancerogeneza, diagnostyka molekularna, spektrometria mas, nukleotydy, uszkodzenia DNA, addukty DNA, metylacja DNA

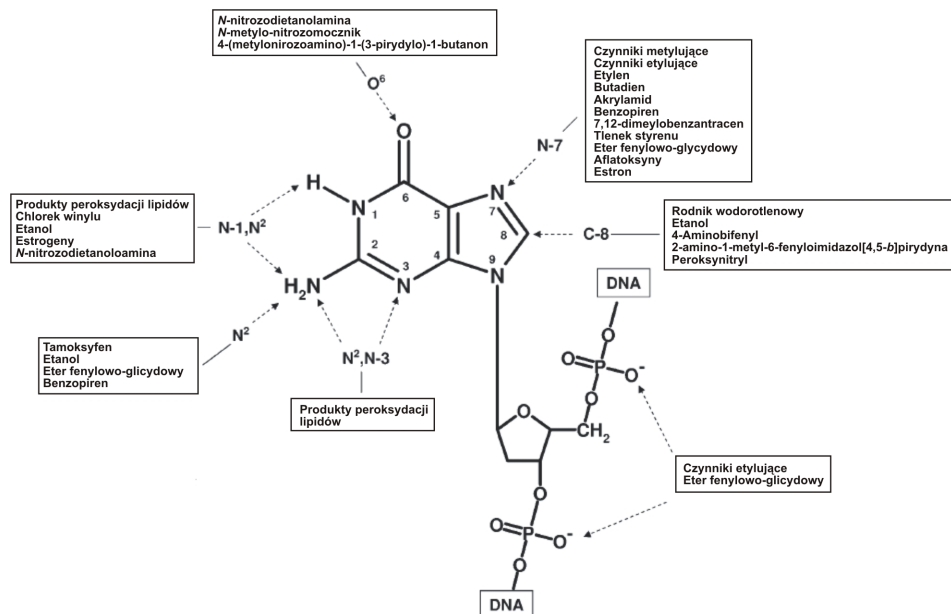
## 1. ADDUKTY DNA I ICH ZNACZENIE BIOLOGICZNE

Uszkodzenia struktury DNA będące wynikiem kowalencyjnej modyfikacji struktury chemicznej puryn i pirymidyn nazywane są adduktami DNA. Szacuje się, że ok. 90% związków chemicznych uważanych za mutagenne lub kancerogenne posiada zdolność, bezpośrednio lub po modyfikacji metabolicznej, wiązania z DNA i tworzenia adduktów [1]. Związki chemiczne, które powodują relatywnie proste zmiany w DNA, takie jak przyłączenie grupy alkilowej czy metylowej, są opisywane jako związki alkilujące. Do związków alkilujących badanych najszerzej w kontekście procesu nowotworzenia należą m.in. chlorek winylu, akroleina czy akrylonitryl. Addukty DNA tworzy wiele związków zawierających pierścienie aromatyczne takie jak aminy aromatyczne (aryloaminy, np. 4-aminobifenyl czy 2-aminofluoren) i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. alfa-benzopiren). Związki arylujące wymagają zazwyczaj tzw. aktywacji metabolicznej do form mogących oddziaływać z DNA, które to reakcje katalizowane są przez oksydazy z rodziny cytochromów P-450 [2]. Do adduktów DNA zalicza się również uszkodzenia oksydacyjne indukowane przez tzw. reaktywne formy tlenu (ROS), czyli m.in. rodniki wodorotlenowe, tlen singletowy, nadtlenek wodoru czy nadtlenoazotyn, często będące produktami metabolizmu wewnątrzkomórkowego. Również światło UV powoduje powstawanie adduktów DNA (tzw. fotoadduktów), do których należą przede wszystkim cyklobutanowe dimery tymidynowe [3]. Wiadomo, że wysoki poziom adduktów DNA związany z behawioralną (np. palenie tytoniu), środowiskową lub zawodową ekspozycją na czynniki mutagenne jest ważnym czynnikiem ryzyka chorób nowotworowych, m.in. raków skóry, płuc, wątroby i trzustki [4–7].

W strukturze puryn i pirymidyn obecnych jest 17 potencjalnych miejsc powstawania adduktów, mających charakter centrów nukleofilowych. Alkilacji może ulec również grupa OH reszty fosforanowej w obrębie szkieletu DNA. Reaktywność poszczególnych miejsc zależy od chemicznej natury cząsteczki, nukleofilowości poszczególnych miejsc i efektów sterycznych [8–10]. Rysunek 1 przedstawia miejsca pierścienia guaniny, w których mogą powstawać addukty indukowane przez różne czynniki chemiczne.

Powstały addukt DNA może zmieniać strukturę przestrzenną i właściwości fizyczne nici DNA, a miejsce uszkodzenia może nie być prawidłowo rozpoznane przez enzymy replikujące DNA lub czynniki transkrypcyjne [8]. Addukty DNA powstałe w wyniku działania kancerogenów lub reaktywnych form tlenu są uważane za pierwszy etap w inicjacji rozwoju nowotworu. Obecność adduktu DNA może prowadzić, na przykład w skutek błędu replikacji DNA w jego pobliżu, do mutacji punktowych, najczęściej o charakterze substytucji lub delecji. Mechanizmami obronnymi komórki umożliwiającymi usunięcie adduktów i odtworzenie prawidłowej struktury DNA są mechanizmy naprawy DNA [11]. Zdolność adduktów DNA do indukcji mutagenyzy i kancerogenyzy zależy od ich struktury chemicznej, stabilności i zdolności do rozpoznania uszkodzenia przez enzymy naprawiające DNA. Struktura przestrzenna danego fragmentu DNA lub kontekst lokalnej sekwencji ma

wpływ na poziom naprawy uszkodzonego nukleotydu lub powstania źle sparowanych zasad w trakcie replikacji DNA [12, 13].



Rysunek 1. Miejsca tworzenia adduktów w nukleotydzie deoksyguanozowym  
 Figure 1. Sites of adduct formation in deoxyguanine nucleotide

## 2. METODY WYKORZYSTYWANE DO ANALIZY ADDUKTÓW DNA

Addukty DNA powstają *in vivo* w relatywnie niewielkich ilościach, a większość z nich jest bardzo szybko usuwana z komórki. Szacuje się, że w genomie pojedynczej komórki można znaleźć jeden addukt na  $10^6$  do  $10^9$  nukleotydów. Dlatego też techniki służące do ich analizy muszą spełniać określone wymagania, z których najważniejszym jest wysoka czułość umożliwiająca wykrywanie ich nawet w bardzo niskich stężeniach. Optymalne techniki analityczne powinny również wykorzystywać niewielką ilość materiału, pozwalać na określenie wielu klas adduktów i umożliwiać szybką analizę wielu próbek.

Czynnikiem najmocniej ograniczającym możliwość badania adduktów w ludzkim DNA jest zazwyczaj jego niewielka ilość dostępna do analiz. Jedynie niektóre addukty DNA mogą być analizowane w sposób nieinwazyjny, tak jak 8-oksoguanozyna, której obecność w moczu jest wynikiem enzymatycznej naprawy DNA [14]. W standardowych procedurach DNA do oznaczeń adduktów izolowane jest z komórek, zazwyczaj z białych ciałek krwi, łożyska lub wymazu z jamy ustnej. Przy pobieraniu materiału należy zwrócić uwagę na moment pobrania próbki, ponieważ addukty

mogą zostać usunięte z materiału genetycznego komórek już w krótkim czasie po ekspozycji na czynnik uszkodzający. W badaniach populacyjnych najczęściej wykorzystywanym materiałem jest DNA uzyskany z limfocytów krwi obwodowej. Z limfocytów otrzymanych z 1 ml krwi izoluje się 20–40 µg DNA. Tak więc metody analityczne wykorzystywane do badań adduktów DNA powinny mieć czułość i specyficzność umożliwiającą wykrywanie jednego adduktu na  $10^8$ – $10^9$  nie zmodyfikowanych nukleotydów używając przy tym niewielkiej ilości DNA (rzędu 10–100 µg) [10].

Badania adduktów DNA przeprowadza się obecnie wieloma technikami analitycznymi, jednakże każda z nich ma swoje ograniczenia w zakresie czułości, ilości wymaganego materiału, swoistości czy możliwości automatyzacji. Tabela 1 zawiera porównanie czułości szeregu technik analitycznych wykorzystywanych do analizy adduktów DNA. Należy zwrócić uwagę, że w zależności od stosowanej metody, addukty mogą być analizowane w trzech różnych formach: zasad azotowych, nukleozydów i nukleotydów. Metodą pozwalającą na wykrywanie wszystkich tych trzech form jest immunodetekcja, natomiast metoda enzymatyczna (tzw.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling) wymaga jako substratu deoksynukleotydów w postaci 3'-monofosforanów.

Tabela 1. Porównanie czułości technik wykorzystywanych do analizy adduktów DNA  
Table 1. Comparison of sensitivity of different techniques used for analysis of DNA adducts

Metoda	Maksymalna czułość (addukt/nukleotyd)	Potrzebna ilość DNA (µg)
HPLC z detekcją elektrochemiczną lub fluorescencyjną	$1/10^8$	1–100
Immunodetekcja z wykorzystaniem swoistych przeciwciał	$1/10^8$	1–200
$^{32}\text{P}$ -postlabeling	$1/10^{10}$	1–10
Spektrometria mas	$1/10^8$	10–100
Akceleratorowa spektrometria mas	$1/10^{12}$	10–2000

Metoda enzymatycznego znakowania zmodyfikowanych nukleotydów radioaktywnym fosforem (tzw.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling) jest szeroko wykorzystywaną metodą detekcji adduktów DNA ze względu na łatwość wykonania, czułość i zdolność wykrywania różnych rodzajów adduktów, przede wszystkim wywoływanych przez policykliczne węglowodory aromatyczne. Metoda ta pozwala na identyfikację jednego adduktu na  $10^9$ – $10^{10}$  nukleotydów i wymaga niewielkiej ilości DNA (1–10 µg). Wadą metody jest praca z dużymi ilościami substancji radioaktywnych, czasochłonność i niewielka możliwość automatyzacji. W przypadku braku wewnętrznego standardu, na podstawie którego określa się wydajność znakowania, oznaczania ilościowe mają jedynie orientacyjny charakter. Metoda ta nie daje również informacji o strukturze adduktów, a złożone wzory adduktów i obfitość zmian wykrywanych w DNA powodują niepewność co do identyfikacji pożądanych adduktów. W metodzie  $^{32}\text{P}$ -postlabeling wyznakowane nukleotydy rozdziela się chromatograficznie w chromatografii cienkowarstwowej (TLC; detekcja następuje dzięki auto-

radiografii) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem radioaktywności [15, 16]. Chromatografia HPLC sprzężona z detektorami elektrochemicznymi wykorzystywana jest do wykrywania uszkodzeń oksydacyjnych (np. 8-oksoguaniny), a sprzężona z detektorami fluorescencji do wykrywania adduktów aromatycznych. W obu tych przypadkach czułość metody jest jednak znacznie niższa niż w przypadku detektorów radioaktywności, a oznaczane mogą być w ten sposób jedynie niektóre typy adduktów DNA. Innymi metodami wykorzystywanymi do detekcji znanych typów adduktów DNA są metody immunologiczne, na przykład immunohistochemia lub ELISA. Metody te pozwalają na detekcję jednego adduktu na  $10^6$ – $10^8$  nukleotydów, a stosowane są do analizy fotoadduktów, adduktów aromatycznych i uszkodzeń oksydacyjnych. Wadą metod immunologicznych jest często niewielka swoistość stosowanych przeciwciał i duża ilość wymaganego materiału [17–20].

Ponieważ każda z wspomnianych wyżej metod posiada szereg wad, trwają próby przystosowania i wykorzystania do badania adduktów DNA nowych fizykochemicznych metod analitycznych. Jedną z takich metod jest spektrometria mas, a przykłady jej zastosowania do badania modyfikacji struktury nukleotydów omówione są w dalszej części pracy.

### 3. METODY SPEKTROMETRII MAS WYKORZYSTYWANE DO ANALIZY MODYFIKACJI NUKLEOTYDÓW

Istota spektrometrii mas polega na rozdzielaniu zjonizowanych cząstek ze względu na wartość stosunku masy –  $m$  do ładunku –  $z$  ( $m/z$ ). Wysokorozdzielcze spektrometry mas umożliwiają wyznaczenie masy cząsteczkowej z dokładnością 0,01–0,001%, co umożliwia określenie składu elementarnego analizowanego jonu. Typowy spektrometr mas składa się z komory jonizacyjnej, analizatora i detektora, sprzężonych z komputerowym systemem kontroli oraz rejestracji i analizy danych. Ponieważ modyfikacje zasad azotowych skutkują zmianą masy, mogą być one łatwo wykrywane za pomocą wielu typów spektrometrów masowych [21]. Każdy spektrometr w zależności od swojej budowy wymaga innych metod przygotowania próbki, wykorzystuje różne techniki jonizacji, metody rozdziału i analizy jonów. W przypadku analizy modyfikowanych 2'-deoksynukleozydów przed analizą na spektrometrach mas niezbędna jest enzymatyczna obróbka i oczyszczenie preparatów DNA. Preparaty DNA trawione są do nukleozydów za pomocą endo- i egzodeoksyrybonukleaz, fosfodiesteraz i fosfataz [22–24]. Uzyskana mieszanina normalnych i zmodyfikowanych nukleozydów może być następnie rozdzielana chromatograficznie dla podwyższenia czułości detekcji [9, 25]. Wczesne prace z wykorzystaniem spektrometrii mas do analizy modyfikacji nukleotydów wykorzystywały jonizację przy pomocy wiązki elektronów (ang. *electron ionization*, EI). Materiał analizowano przez bezpośrednie wstrzyknięcie do komory jonizacyjnej dużej ilości kwasów nukleinowych, na przykład w celu analizy N7-metylowanej guaniny wyko-

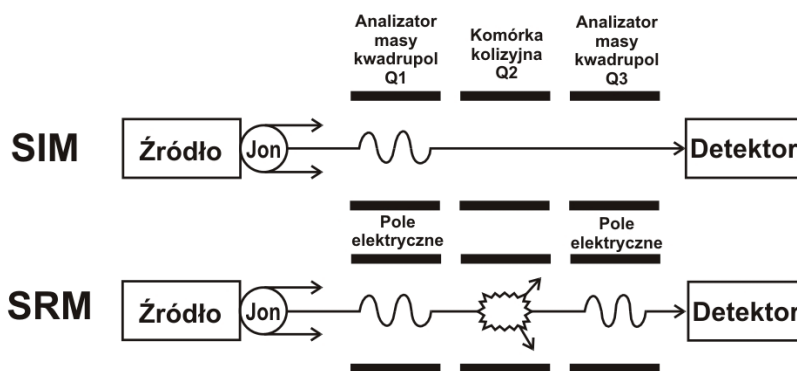
rzystano 50 mg DNA [26]. Obecnie do analizy adduktów używa się DNA w ilości kilkudziesięciu mikrogramów, próbki hydrolizuje się enzymatycznie i frakcjonuje chromatograficznie. Najczęściej wykorzystywane metody to chromatografia gazowa z detektorem mas z chemiczną jonizacją ujemną, oraz połączenie chromatografii HPLC z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym (elektrorozpraszanie, ang. *electrospray ionization*, ESI) [9]. Chromatografia gazowa z detekcją mas z chemiczną jonizacją ujemną (GC-MS-NCI) jest z powodzeniem wykorzystywana do analizowania kilku rodzajów adduktów DNA powstających w wyniku alkilacji zasad DNA przez N-nitrozoaminy, np. O<sup>6</sup>-butylguanina (O<sup>6</sup>BuG) [27, 28]. Wadą tej metody jest konieczność tzw. derywatywacji, czyli modyfikacji w celu przekształcenia trudno lotnych związków w ich lotne i trwałe pochodne. Wprowadzona niedawno modyfikacja metody NCI, technika jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (API) jest wykorzystywana do detekcji nietrwałych i termicznie labilnych adduktów DNA [17, 29].

Badania nad możliwością zastosowania spektrometrii mas do analizy uszkodzeń DNA zostały zintensyfikowane po rozpowszechnieniu urządzeń wykorzystujących technikę jonizacji przez elektrorozpraszanie. Spektrometry tego typu pozwalają na bezpośrednią analizę polarnych związków bez potrzeby ich derywatywacji i umożliwiają bezpośrednie podłączenie chromatografii ciekowej (ang. *liquid chromatography*, LC) w układzie „on-line”. Technika ESI polega na tworzeniu w polu elektrycznym aerozolu roztworu cząsteczek analizowanej substancji, które jonizują się podczas odparowania rozpuszczalnika poprzez przyłączenie lub odłączenie protonów (lub innych jonów) [30]. Proces jonizacji w systemie ESI zachodzi w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Frakcje z LC (lub kompletna mieszanina) wprowadzane są do mającej kształt stożka komory jonizacyjnej przez kapilarną sondę, na której koniec przykładane jest wysokie napięcie w stosunku do elektrody znajdującej się na końcu stożka (zwykle pomiędzy 2 a 5 kV). Skutkuje to powstaniem gradientu potencjału w komorze jonizacyjnej. Przepływ azotu współosiowy do stalowej kapilary skutkuje powstaniem aerozolu naładowanych kropeł, a po odparowaniu rozpuszczalnika do powstania jonów w fazie gazowej, które przez stożek komory jonizacyjnej przechodzą do próżni analizatora [31, 32].

Do badań adduktów DNA w spektrometrach ze źródłem jonów typu ESI najczęściej wykorzystuje się analizatory z systemem trzech kwadrupoli. Kwadrupol to analizator zbudowany z czterech równoległych, symetrycznych prętów będących elektrodami, między którymi tworzone jest oscylujące pole elektryczne. Potrójny kwadrupol umożliwia przeprowadzenie tandemowej spektrometrii mas. W układzie takim pierwszy i trzeci kwadrupol (oznaczane jako Q1 i Q3) są analizatorami wartości m/z jonów, a drugi kwadrupol (Q2) jest komorą kolizyjną zawierającą niewielką ilość argonu, gdzie analizowane jony poddawane są fragmentacji indukowanej kolizyjnie (CID). Dwie główne metody analizy adduktów DNA w potrójnym kwadrupolu to tryb kontroli wybranych jonów (SIM) i tryb kontroli wybranych reakcji (SRM). W analizie SIM pierwszy kwadrupol ustawiony jest w taki sposób,



aby przepuszczał do detektora tylko określone jony, natomiast analiza SRM pozwala na wybranie jonu w pierwszym kwadrupolu, który następnie w Q2 ulega dysocjacji indukowanej kolizyjnie do jonów, których masy określone są w Q3 (schematycznie przedstawione na Rys. 2) [10]. Połączenie chromatografii HPLC ze spektrometrami z jonizacją typu ESI i tandemową spektrometrią mas (LC-ESI/MS/MS) wykorzystane zostało do analizy adduktów DNA powstałych na skutek działania kancerogennych nitrozoamin obecnych w dymie tytoniowym: 4-(metylnitrozoamino)-1-(3-pirydył)-1-butanon i *N*'-nitrozonornikotyina [33–35], oraz adduktów powstałych na skutek ekspozycji na policykliczne węglowodory aromatyczne [36].



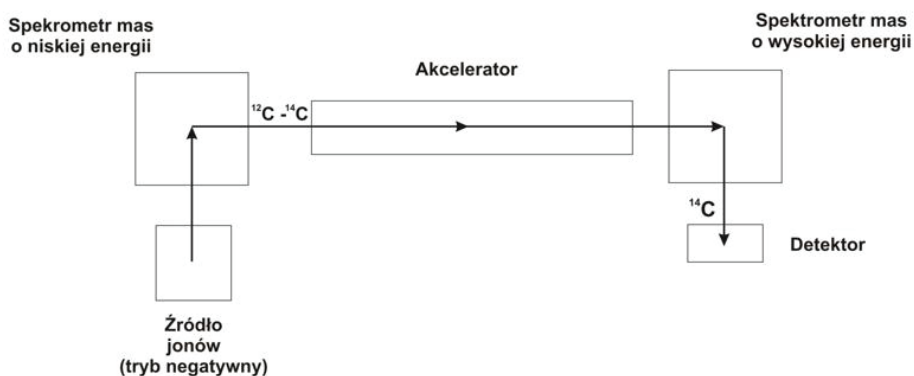
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie metod analizy jonów z wykorzystaniem spektrometru z trzema kwadrupolami

Figure 2. Scheme of methods of ion analysis in three-quadropole mass spectrometer

Innym rodzajem urządzenia wykorzystywanego do analizy adduktów DNA jest spektrometr mas z pułapką jonową (ang. *ion trap*, IT), umożliwiającą akumulację wybranych jonów w celu poprawy proporcji wartości sygnału analizowanej substancji do sygnału tła (tzw. szumu) [17]. Spektrometry wykorzystujące pułapki jonowe z kwadrupolowym analizatorem mas (TQ/MS) są rzadko używane do analizy adduktów DNA indukowanych w warunkach *in vivo* ponieważ wolne tempo skanowania i jego mała czułość utrudniają detekcję adduktów występujących w śladowych ilościach. Dlatego w zastosowaniach bioanalitycznych częściej wykorzystywane są spektrometry z analizatorami będącymi kwadrupolową pułapką jonową (QIT/MS). Różnica pomiędzy tymi dwoma technikami leży w sposobie działania analizatora masy. W technice TQ/MS analizator działa jako filtr masy i w jednym momencie przepuszcza tylko jony o określonej wartości  $m/z$ . Technika QIT/MS pozwala na przetrzymywanie jonów i wyrzucanie do detektora kolejnych grup jonów o określonym  $m/z$  [17]. Technika ta powszechnie wykorzystywana jest do analizy adduktów DNA będących pochodnymi 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazol[4,5-*b*]pirymidyny (PhIP) [17, 37, 38].

Najbardziej czułą metodą spektrometrii mas, która może być wykorzystana do analizy adduktów DNA jest tzw. akceleratorowa spektrometria mas (ang. *Accelerator*

*Mass Spectrometry*, AMS), która umożliwia wykrywanie jednego adduktu na  $10^{12}$  nukleotydów. Spektrometria AMS pozwala na rejestrację jonów zawierających rzadko występujące izotopy (np.  $^{14}\text{C}$ ) i ich oddzielenie od jonów zawierających pozostałe formy pierwiastka (np.  $^{12}\text{C}$ ). W klasycznej spektrometrii mas, wykrywalność metody (minimalna ilość atomów substancji analizowanej) jest silnie ograniczona poprzez wymaganie wysokiej rozdzielczości masowej koniecznej do rozdzielenia izobarów. Podstawowa różnica pomiędzy techniką AMS, a innymi metodami spektrometrii mas polega na nadaniu jonom dużego przyspieszenia poprzedzającego analizę mas. Spektrometr AMS stanowi połączenie dwóch rodzajów spektrometrów (Rys. 3). Pierwszy spektrometr mas o niskiej energii selekcjonuje jony ujemne o właściwej masie i przepuszcza je do akceleratora. Dzięki obecności akceleratora mas jony są przyspieszane i przeładowywane tj. następuje zmiana ładunku jonów na dodatni poprzez przepuszczanie tych jonów przez cienką warstwę substancji (np. cienka folia węglowa), na której zostają elektrony. Jony po przyspieszeniu trafiają do spektrometru o wysokiej energii, gdzie selekcjonowane są przez układ kwadrupola pod względem masy i ładunku, a następnie kierowane do układu magnesów ponownie rozpędzających jony i selekcjonujących je pod względem przyspieszenia zanim zostaną poddane analizie na detektorze. Drugi spektrometr selekcjonuje jony zawierające rzadko występujące izotopy.



Rysunek 3. Schemat spektrometru wykorzystującego technikę AMS (zaznaczono kierunek przepływu jonów)

Figure 3. Scheme of AMS mass spectrometer (flow of ions is shown)

Główne ograniczenie techniki AMS polega na jej zależności od obecności izotopów  $^{14}\text{C}$  lub  $^3\text{H}$  w badanej cząsteczce. Oznacza to, że obecnie technika ta ograniczona jest przede wszystkim do układów eksperymentalnych, w których wykorzystuje się związki znakowane wybranymi izotopami. Jednak podejmowane są próby wykorzystania techniki AMS do wykrywania adduktów DNA indukowanych w ludzkim materiale genetycznym przez naturalne czynniki zawierające węgiel  $^{14}\text{C}$  [39–41]. Modyfikacje tej metody pozwalają na oznaczanie 8-metylodeoksoguanozyny [42], oraz adduktów indukowanych przez oksaliplatinę [43] i adriamycynę [39].

#### 4. WYKORZYSTANIE SPEKTROMETRII MAS DO ANALIZY METYLACJI DNA

Chemiczną modyfikacją struktury DNA występującą naturalnie w komórkach kręgowców jest metylacja cytozyny. Metylacji podlega węgiel C5 pierścienia cytozyny, w efekcie czego powstaje 5-metylocytozyna (5-mC). Szacuje się, że 5-mC stanowi około 4% wszystkich nukleotydów deoksycytozynowych w komórkach ludzkich [44]. Metylacja cytozyn jest procesem enzymatycznym, katalizowanym przez metylotransferazy DNA, w którym donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina. W większości przypadków metylacja dotyczy sekwencji 5'-CG-3' zwanych wyspami CpG, lecz może także dotyczyć sekwencji CpA i CpT [45, 46]. Metylacja DNA jest jednym z epigenetycznych mechanizmów kontroli ekspresji genów, a metylacja wysp CpG w okolicach promotorowych jest czynnikiem inicjującym zmiany struktury chromatyny i wyciszenie transkrypcji. Metylacja DNA jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju organizmu, a jej nieprawidłowy przebieg może prowadzić do rozwoju wielu chorób. Błędy w metylacji DNA nagromadzające się wraz z wiekiem mogą wpływać na funkcjonowanie organizmu. Zmiany w metylacji DNA mogą aktywować onkogeny i hamować ekspresję genów supresorowych, przyczyniając się do rozwoju nowotworów. Szacuje się, że w nowotworach 5% wszystkich genów jest hipermetylowana [47].

Biorąc pod uwagę jej znaczenie funkcjonalne metylacja DNA jest potencjalnie ważnym klinicznym markerem molekularnym w diagnostyce nowotworów. Jedną z metod analitycznych stosowanych w praktyce diagnostycznej do badania metylacji DNA, również w swoistych sekwencjach genowych, wykorzystuje spektrometrię mas typu MALDI-ToF [48]. W przypadku jonizacji typu MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption-ionization*) cząsteczki analitu (w tym przypadku oligonukleotydy) ko-krystalizują z cząsteczkami matrycy absorbującej promieniowanie ultrafioletowe generowane przez laser; zazwyczaj jako matryce wykorzystuje się kwasy aromatyczne. W efekcie naświetlenia laserem z mieszaniny kryształów matrycy i analitu desorbowane są protonowane cząsteczki analizowanej substancji. Analizator czasu przelotu jonów (ang. *time of flight*, ToF) rejestruje czas przelotu zjonizowanych cząsteczek (zwykle wynoszący od 0,01 do 1 ms), który jest wprost proporcjonalny do pierwiastka z wartości  $m/z$  jonów poddawanych analizie. Spektrometry MALDI-ToF umożliwiają analizę cząsteczek w szerokim zakresie mas od kilkuset do kilkuset tysięcy Da [49, 50]. Metoda MALDI-ToF wykorzystywana jest do pomiaru masy cząsteczkowej produktów reakcji PCR wykrywającej obecność 5-metylo-cytozyny. W pierwszym etapie analizy DNA jest denaturowane i taktowane wodorosiarczanem, który powoduje deaminację cytozyny (C) do uracylu (U), natomiast 5-metylo-cytozyna jest oporna na działanie tego związku; konwersja C do U powoduje zmianę zapisu sekwencji nukleotydów w analizowanym genie. Następnie w reakcji PCR wykorzystującej startery swoiste dla wybranego genu i uzupełnione o sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7 syntetyzuje się nić, w której w miejscu komplementarnym do U występuje A, a w miejscu kom-



DNA do mononukleotydów (np. w obecności kwasu mrówkowego) i rozdzielenie cytozyny od 5-metylocytozyny za pomocą chromatografii wykorzystującej jako nośnik kwas fluoroantymonowy [56, 57]. Metoda ta umożliwia globalny pomiar 5-metylo-cytozyny, nie pozwala jednak na analizę swoistego wzoru metylacji w obrębie poszczególnych genów.

## PODSUMOWANIE

Modyfikacje DNA, zarówno uszkodzenia nukleotydów indukowane np. przez środowiskowe związki kancerogenne, jak i endogenna metylacja cytozyn, stanowią bardzo ważny czynnik regulujący funkcjonowanie organizmu i mający istotny wpływ na ryzyko groźnych chorób (przede wszystkim chorób nowotworowych). Możliwość jakościowej i ilościowej analizy tych modyfikacji ma olbrzymie znaczenie praktyczne, nie tylko dla badań naukowych, ale również dla diagnostyki medycznej. Techniki spektrometrii mas (zwłaszcza w połączeniu z technikami chromatograficznymi), ze względu na relatywnie wysoką czułość oraz możliwość analizy złożonych mieszanin biologicznych, wydają się być bardzo dobrym narzędziem analitycznym dla badania modyfikacji materiału genetycznego. Racjonalne wykorzystanie tych narzędzi wymaga oczywiście optymalnego dostosowania właściwości różnych typów spektrometrów do konkretnej aplikacji praktycznej. Można jednak przypuszczać, że w przyszłości metody spektrometrii mas wejdą do szerszej praktyki laboratoryjnej i będą wykorzystywane dla celów medycznych również w aspekcie analizy modyfikacji i uszkodzeń materiału genetycznego.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] O.J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 34.
- [2] M.P. Chiarelli, O.J. Lay, *Mass Spectrom. Rev.*, 1992, **11**, 447.
- [3] D.S. Goodsell, *The Oncologist*, 2001, **6**, 298.
- [4] F. Liu, Y. He, X. Peng, W. Wang, X. Yang, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2010, **11**, 1257.
- [5] K. Osawa, A. Miyaishi, K. Muchino, Y. Osawa, N. Inoue, C. Nakarai, A. Tsutou, Y. Kido, M. Yoshimura, N. Tsubota, J. Takahashi, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2010, **11**, 1181.
- [6] S. Landi, *Mutat. Res.*, 2009, **681**, 299.
- [7] L. Shack, C. Jordan, CS Thomson, V. Mak, H. Moller, B.M.C. *Cancer*, 2008, **8**, 271.
- [8] J. Roboz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 79.
- [9] P.B. Farmer, K. Brown, E. Tompkins, V.L. Emms, D.J.L. Jones, R. Singh, D.H. Phillips, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **207**, 293.
- [10] R. Singh, P.B. Farmer, *Carcinogenesis*, 2006, **27**, 178.
- [11] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kaçmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, **73**, 39.
- [12] P. Wiślak, *Kosmos*, 2002, **1**, 5.
- [13] J.H. Banoub, P.A. Limbach, CRC Press, 2009, **1**, 95.
- [14] Z. Davanipour, H.E. Poulsen, A. Weimann, E. Sobel, *BMC Endocr. Disord.*, 2009, **9**, 22.
- [15] J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S. Tannenbaum, G. Wogan, H. Bartsch, *Carcinogenesis*, 1998, **19**, 2081.

- [16] K. Yang, J. Fang, F. Chung, K. Hemminki, *IARC Sci. Publ.*, 1999, **150**, 205.
- [17] A.K. Goodenough, H.A. Schut, R.J. Turesky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 236.
- [18] C.M. Dale, R.C. Garner, *Food Chem. Toxicol.*, 1996, **34**, 905.
- [19] M.C. Poirier, A. Weston, *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104**, 883.
- [20] H. Kaur, B. Halliwell, *Biochem J.*, 1996, **318**, 21.
- [21] S. Douthwaite, F. Kirpekar, *Methods Enzymol.*, 2007, **425**, 1.
- [22] E.P. Quinlivan, J.F. Gregory, *Anal. Biochem.*, 2008, **373**, 383.
- [23] D. Mohamed, M. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 805.
- [24] S. Mowaka, M. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 819.
- [25] J.L. Ravanat, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2005, **30**, 100.
- [26] W. Lijinsky, J. Loo, A.E. Ross, *Nature*, 1968, **218**, 1174.
- [27] M. Bonfanti, C. Magagnotti, A. Galli, R. Bagnati, M. Moret, P. Gariboldi, R. Fanelli, L. Airoidi, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 6870.
- [28] L. Airoidi, A. Galli, C. Magagnotti, R. Bagnati, M. Lolli, M. Fanelli, *Cancer Research*, 1992, **52**, 6699.
- [29] H. Koc, J.A. Swenberg, *J. Chromatogr.*, 2002, **778**, 323.
- [30] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science*, 1989, **246**, 64.
- [31] N.B. Cech, C.G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 362.
- [32] W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai, Y. Wang, *Biochem. J.*, 2001, **355**, 545.
- [33] S.S. Hecht, P.W. Villalta, S.J. Sturla, G. Cheng, N. Yu, P. Upadhyaya, M. Wang, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 588.
- [34] N.M. Thomson, R.S. Mijal, R. Ziegel, N.L. Fleischer, A.E. Pegg, N.Y. Tretyakova, L.A. Peterson, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 1600.
- [35] M.K. Dennehy, R.N. Loepky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 556.
- [36] R. Singh, F. Teichert, A. Seidel, J. Roach, R. Cordell, M. Cheng, H. Frank, W.P. Steward, M.M. Manson, P.B. Farmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 2329.
- [37] E.E. Bessette, A.K. Goodenough, S. Langouet, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 809.
- [38] E.E. Bessette, S.D. Spivack, A.K. Goodenough, T. Wang, S. Pinto, F.F. Kadlubar, R.J. Turesky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 1234.
- [39] K.E. Coldwell, S.M. Cutts, T.J. Ognibene, P.T. Henderson, D.R. Phillips, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 1.
- [40] K.W. Turteltaub, J.S. Felton, B.L. Gledhill, J.S. Vogel, J.R. Southon, M.W. Caffee, R.C. Finkel, D.E. Nelson, I.D. Proctor, J.C. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**, 5288.
- [41] K.H. Dingley, M.L. Roberts, C.A. Velsko, K.W. Turteltaub, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**, 1217.
- [42] E.M. Tompkins, P.B. Farmer, J.H. Lamb, R. Jukes, K. Dingley, E. Ubick, K.W. Turteltaub, E.A. Martin, K. Brown, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 883.
- [43] S.S. Hah, R.A. Sumbad, R.W. de Vere White, K.W. Turteltaub, P.T. Henderson, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 1745.
- [44] H. Cao, Y. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 4833.
- [45] P.M. Das, R. Signal, *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 4632.
- [46] K. Fabianowska-Majewska, *Acta Haematol. Pol.*, 2000, **31**, 399.
- [47] S.F. Gilbert, *J. Biosci.*, 2009, **34**, 601.
- [48] M. Ehrich, M.R. Nelson, P. Stanssens, M. Zabeau, T. Liloglou, G. Xinarianos, C.R. Cantor, J.K. Field, D. Boom, *PNAS*, 2005, **102**, 15785.
- [49] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- [50] C.E. Costello, *Biophys. Chem.*, 1997, **68**, 173.
- [51] P. Stanssens, M. Zabeau, G. Meersseman, G. Remes, Y. Gansemans, N. Storm, R. Hartmer, C. Honisch, C.P. Rodi, S. Böcker, D. van den Boom, *Genome Res.*, 2004, **14**, 126.

- 
- [52] D. K. Vanaja, M. Ehrich, D.V. Boom, J.C. Cheville, R.J. Karnes, D.J. Tindall, C.R. Cantor, C.Y.F. Young, *Cancer Invest.*, 2009, **27**, 549.
- [53] M. Frommer, L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, C.L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89**, 1827.
- [54] P. Schatz, D. Dietrich, M. Schuster, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 1.
- [55] S.J. Clark, A. Statham, C. Stirzaker, P.L. Molloy, M. Frommer, *Nature Protocols*, 2007, **1**, 2353.
- [56] R.M. Kok, D.E. Smith, R. Barto, A.M. Spijkerman, T. Teerlink, H.J. Gellekink, C. Jakobs, Y.M. Smulders, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, **45**, 903.
- [57] N. Tretyakova, R. Guza, B. Matter, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2008, **52**, 49.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 stycznia 2011

